百香果雙生病毒發生現況

鄭櫻慧 [1,*]　陳金枝 [1]　鄧汀欽 [1]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組
*聯絡作者: 鄭櫻慧； E-mail: YHCHeng@tari.gov.tw

摘 要

在台灣感染百香果的病毒計有胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus,* CMV)、東亞百香果病毒 (*East Asian passiflora virus,* EAPV)、百香果斑駁病毒 (Passion fruit mottle virus, PaMV)、百香果縺葉病毒 (Passion fruit crinkle virus, PCV) 4 種。2011 年 3 月在埔里地區採集到黃綠不均且葉片變形百香果樣本，利用 ELISA 檢測未受到上述 4 種病毒感染，利用滾輪法 (rolling circle amplification, RCA) 卻測到疑似雙生病毒感染。RCA 產物以 BamHI 處理，得到約 3.0 Kb 之產物，選殖至載體，選殖株以 EcoRI 酵素處理確認時出現 2 類不同切位 DNA 片段。定序分析後分別有 2745 與 2732 個核苷酸，與 GenBank 登錄之序列比對結果，2745 個核苷酸者(Accession No. KC161185) 與一品紅捲葉病毒 (*Euphorbia leaf curl virus,* EuLCV) DNA-A 有 98.5%的相同度，2732 個核苷酸者 (Accession No. KC161184) 與番木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl virus,* PaLCuGDV) DNA-A 有 91.7%的相同度。根據 2 病毒序列分析結果設計 PCR 引子對，利用電泳分析調查 2 種病毒發生情形。此 2 病毒應已普遍發生於百香果台農 1 號多時，於宜蘭、花蓮、苗栗及南投地區等百香果栽培區均有發現，因為台農 1 號百香果需經由嫁接苗繁殖，因此該 2 種病毒隨著嫁接苗普遍發生。病毒感染後造成百香果葉片斑駁、葉面不平整，各百香果園觀察到的病徵嚴重程度不一，但進入春夏季之後氣溫回升，葉片變形情況趨於輕微至觀察不到病徵，百香果生長回復正常，而造成忽略。

關鍵詞：百香果、一品紅捲葉病毒、番木瓜捲葉廣東病毒

緒 言

百香果(*Passiflora* spp.)又稱時計果、西番蓮、西番果、雞蛋果。屬於西番蓮科(*Passifloraceae*)、西番蓮屬 (*Passiflora* spp.)，為多年生蔓性果樹，原生於南美巴西，共有 450 餘種，其中 60 餘種可供食用。百香果營養豐富，果汁香味濃郁，

散發多種水果汁香氣，被稱為“果汁之王”。百香果原生於巴西，19 世紀後分佈於熱帶與亞熱帶，目前商業栽培地區包括有澳洲、巴西、斐濟群島、新幾內亞、南非、哥倫比亞、委內瑞拉、越南、中國大陸及台灣等地。百香果之商業栽培品種以紫百香果 (*Passiflora edulis*) 及黃百香果 (*P. edulis* f. sp. *flavicarpa*) 為主，前台灣盛行的百香果品種台農 1 號即為紫色種百香果為母本與黃色種百香果為父本雜交而成[1]。

台灣於日據時代由日本引進紫色種百香果，因酸度不足而放棄。次於民國 50 年代之後由美國巴西、南美及夏威夷等地引進黃色百香果經濟栽植。但黃色種百香果具自交不親和性，加上台灣缺乏適合的授粉昆蟲，人工授粉需耗費大量人力，成為大量推廣瓶頸。1975 年農試所鳳山分所林盈達先生以具自交親和性的紫色種百香果為母本與自交不親和性的黃色種百香果為父本雜交，選育出園藝性狀優異，具自交親和性且可由本土蜜蜂授粉之台農 1 號[1]。台農 1 號原以扦插繁殖，因對鐮胞菌引起的基腐病 (Fusarium basal rot) 相當罹病，後以抗病的黃色種作為根砧，嫁接台農 1 號的嫁接苗繁殖。百香果栽培面積因此迅速擴張，民國 70 年正式推廣，至 73 年全省栽培面積達 1400 公頃[1, 5]。70 年左右病毒病害即開始出現，並隨著嫁接苗擴散，病毒病害為嚴重影響百香果果品及產值最鉅之病害因素，尤其木質化病毒病更會嚴重影響植株生長勢及造成果實之畸型分化，為百香果生產之限制因子。農試所張清安博士等人研究，共發現感染百香果的百香果木質化病毒 (*Passionfruit woodiness virus*, PWV)、百香果斑紋病毒 (*Passionfruit mottle virus*, PaMV) 、百香果漣葉病毒 (*Passionfruit crinkle virus*, PCV) 3 種 potyviruses 與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 4 種病毒[2, 3, 4, 5, 9, 10]。張博士團隊研發病毒檢測系統建立健康種苗繁殖系統，自民國七十年代末開始採用全園每年更換無病毒新苗之方式，近二十餘年來已可有效控制病毒病害之威脅[6, 7]。目前台灣地區的百香果種植面積約 400 餘公頃，主要產地在南投、台中、嘉義與花東一帶，以埔里為國內百香果之第一大栽培區，約佔全國百香果栽培面積之 70%以上。

感染百香果的 potyviruses 之中，PWV 因 2006 年日本學者報告中指出台灣 PWV 之 CP 基因核苷酸序列與日本命名之東亞百香果病毒 AO 系統 (*East Asian Passiflora virus* Strain AO, 簡稱 EAPV-AO)具有超過 90%相同度，建議改名為 EAPV[15, 16, 17]；百香果斑紋病毒之核苷酸序列亦與同日本學者命名之東亞百香果病毒 IB 系統 (*East Asian Passiflora virus* Strain IB, 簡稱 EAPV-IB) 亦具高相同度[2, 4]。

台灣感染百香果的雙生病毒

農試所 100 年間在埔里大坪頂地區採集到黃綠不均且葉片變形百香果樣本，檢測未受到上述 4 種病毒感染，利用滾輪法 (rolling circle amplification, RCA)[20]

卻測到疑似雙生病毒感染。RCA 產物以 BamHI 處理，得到約 3.0 Kb 之產物，選殖至載體，選殖株以 EcoRI 酵素處理確認時出現 2 類不同切位 DNA 片段。定序分析後分別有 2745 與 2732 個核苷酸，與 GenBank 登錄之序列比對結果，2745 個核苷酸者與一品紅捲葉病毒 (*Euphorbia leaf curl virus*, EuLCV) DNA-A 有 98.5%的相同度，2732 個核苷酸者與廣東番木瓜捲葉病毒 (*Papaya leaf curl virus*, PaLCuGDV) DNA-A 有 91.7%的相同度[12]，於 101 年 10 月通報動植物防疫檢疫局。其中番木瓜捲葉廣東病毒已於 92 年由臺灣大學洪副教授挺軒發表感染木瓜[11]，而一品紅捲葉病毒在台灣尚無報告紀錄，但於中國大陸有感染聖誕紅的紀錄[18]。

2 種 *Begomovirus* 屬之雙生病毒 EuLCV 與 PaLCuGDV 都為單基因體 (monopartite)，以粉蝨為媒介昆蟲，以永續性方式媒介 (persistent manner)，尚無種子傳播的記錄。田間栽植之百香果有單獨感染 PaLCuGDV 或複合感染此二種雙生病毒者，通常在春季栽培初期造成葉片嵌紋、斑駁、不平整變形等病徵，待進入 5 月天氣轉暖後葉片變形情況趨於輕微至觀察不到病徵，新葉恢復正常生長。

由於雙生病毒在植物體內濃度低且不穩定，聚合酵素連鎖反應是目前應用廣泛且靈敏的一項技術。未偵測田間病毒發生狀況，根據 2 病毒序列分析結果設計 PCR 引子對 EPup/Edw/pdw，此引子對在 EuLCV 感染組織中增幅 235 bp 之 DNA 產物，感染 PaLCuGDV 組織中增幅 345 bp 之 DNA 產物，利用電泳分析即可區分 2 種病毒。101 年以百香果主要產區埔里大坪頂 7 個百香果園為主的調查中，此 2 種病毒在百香果分布情形，260 個台農 1 號百香果葉片樣本都測到 PaLCuGDV 與 EuLCV，只有 1 個果園的 6 個樣本測到 PaLCuGDV。之後於其他地區調查中，2 雙生病毒普遍發生於常見百香果台農 1 號，於宜蘭、花蓮、苗栗及南投地區等百香果栽培區均有發現。大坪頂地區採集的滿天星百香果 20 個樣本中，5 個樣本測到 EuLCV 與 PaLCuGDV 複合感染。台中東勢地區採集的黃金百香果樣本未測到此 2 病毒。另外，各 50 個自行播種的黃金種百香果與台農 1 號子代實生苗都未測到 2 種雙生病毒。2 種雙生病毒應是經由嫁接苗接穗傳播，因此病毒隨著台農 1 號百香果嫁接苗普遍發生。另一新興品種滿天星因栽培地區鄰近台農 1 號，可能因此受粉蝨傳播感染，但因園區種的也是嫁接苗，不排除接穗母株受到感染，也經由嫁接苗傳播。定序分析感染滿天星品種的 PaLCuGDV 與 EuLCV，2 病毒 DNA-A 與台農 1 號上之分株之相同度均達 99.0%以上。

國際間雙生病毒感染百香果的發生概況

目前國內所鑑定之雙生病毒與國外已發現者乃不同之雙生病毒系統，國外之系統如波多黎各之 *Passion flora leaf mottle virus* (1996 年定名為 *Jatropha mosaic virus*, JMV)[8, 14]，此病毒單獨感染百香果即會引起葉片嚴重捲曲與變形、

葉片及果實之斑駁徵狀，因而降低果實品質與產量。此病毒只能以粉蝨媒介傳播，無法經機械接種或種子傳播。

巴西發現 2 種感染黃色種百香果的雙生病毒 *Passion flower little leaf mosaic virus* (PLLMV) [14, 19]與 Passionfruitsevere leaf distortion virus (PSLDV) [13]。黃色種百香果是巴西最重要的栽培品種，占出口量 70%以上。PLLMV 感染百香果時會引起嚴重黃化嵌紋及皺縮變形，影響生長發育。PLLMV 可藉機械接種感染煙草 *Nicotiana benthamiana*，亦可藉嫁接感染甜百香果 (*P. alata*)等 4 種不同種的百香果[19]。PSLDV 也引起葉片嚴重變形等病徵，其 CP 基因與 PLLMV 具 91%相同度，也與巴西感染番茄之 begomovirus 具有高相同度，與 *Tomato chlorotic mottle virus* 達 77%、*Tomato yellow spot virus* 達 74%相同度，以粒子槍接種又能感染百香果與茄科之曼陀羅(*Datura stramonium*)及數種煙草 (*N. benthamiana, N. tabacum, N. clevelandii*)，推測 PSLDV 可能由感染西番蓮科與茄科之雙生病毒經假性基因重組而來，但粒子槍接種試驗未能感染番茄，其後續影響仍待觀察[13]。

國外的 3 種雙生病毒感染百香果都造成嚴重病徵導致產量減少。其中波多黎各之 JMV 與巴西之 PLLMV 都只有部分地區果園，尚未普遍發生。巴西百香果園發生 PLLMV 時，也監測到高密度族群的媒介昆蟲 B type 煙草粉蝨，因粉蝨在黃色種百香果大量發生，造成病毒有效率傳播[19]。

結 論

台灣栽培之台農 1 號百香果單獨或複合感染此 2 種雙生病毒，雖然在苗期或冬春季栽培初期造成葉片嵌紋、斑駁、不平整變形等病徵，但進入春末夏初天氣轉暖，百香果生長勢加快後，葉片變形情況趨於輕微至觀察不到病徵，新葉恢復正常生長。2 病毒對台農 1 號的生長、產量與果實品質的影響仍待進一步探討。台灣百香果園粉蝨族群數量不高，粉蝨還不是百香果的重要害蟲。國外栽培之黃色種百香果粉蝨族群大量發生的紀錄，國內新興品種如滿天星等，亦屬黃色種百香果，應密切注意果園中粉蝨數量。台灣也到處都有番茄栽培與感染番茄的雙生病毒發生，會否因基因重組或衛星 DNA，出現造成嚴重病徵的病毒系統也應繼續監測。

為控制病蟲害發生及維持果實品質，台灣的百香果生產技術以每年換新嫁接苗為模式。目前已建立適合產業應用的健康種苗繁殖系統，只要有無病毒接穗株，馬上可加入產業應用。鑑於台灣對台農 1 號品種的高度依賴，以生長點組織培養等方法建立去病毒技術，獲得無病毒之母本後，可進一步栽培成為採穗嫁接用之母本來源，再藉由嚴格控制接穗母株的清潔度，以確保完全無病毒之母本源。將來若有其他病毒入侵，亦可再以去病毒技術獲得無病毒母本。嫁接苗之砧木為黃色種百香果，若使用實生苗砧木可避免病毒乾染，如果使用扦插苗，接穗與砧木

均須確保無病毒以維持健康苗之品質。

百香果為高經濟價值的水果，具多面向的產業發展特質，除可直接供應鮮食、果汁等加工產品外，嫁接苗的種苗繁殖生產及銷售或外銷，更是此產業的另一重要經濟利基，近幾年我國輸出百香果種苗有紀錄為越南、泰國及日本，其中以越南為大宗，上述國家目前無相關檢疫條件，出口越南之嫁接苗當地認可台灣官方所發之檢疫證明而能隨機出口。百香果栽培過程中病毒病的危害為影響生長發育與果實品質，因此無病毒健康種苗乃提供優質百香果生產之根基，搭配良好的共同防治栽培制度，是決定百香果永續栽培之重要關鍵。

引用文獻

1. 林盈達. 1982. 百香果雜交 F1 品種之育成. 中國農藝 28: 190.
2. 陳金枝、鄭櫻慧、鄧汀欽. 2014. 無病毒健康種苗對百香果產業發展之重要性及未來展望. 植物種苗生技 37: 63-71.
3. 張清安. 1990. 百香果毒素病之特性與防治策略. 農民推廣專刊. 台灣省農業試驗所編印. 行政院農業委員會及台灣省政府農林廳編印. 台中. 10 PP.
4. 張清安. 2015. 台灣百香果病毒病研究與防治之回顧. 2015 年海峽兩岸植物病理學術研討會專刊. P111-122. 中華民國植物病理學會、國立中興大學植物病理學系編印. 台中. 256 PP.
5. 張清安、王惠亮、周定芸、陳玉蓉. 1981. 百香果毒素病之調查與鑑定. 植物保護學會刊 23: 267.
6. 張清安、林盈達. 1991. 百香果無病毒苗田間應用之效果評估. 台灣農業 27: 95-101.
7. 張清安、林盈達. 1992. 無病毒百香果苗栽植後之再感染生態及其防治病毒病效果評估. 植物病理學會刊 1: 140-146.
8. Brown, J. K., Bird, J., and Fletcher, D. C. 1993. First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. 77: 1246
9. Chang, C. A..1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newlyreconized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. Phytopathology 82: 1358-1363.
10. Chang, C. A., and Lin, H. H. 1989. Passionfruit crinkle virius, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. Plant Prot. Bull. 31: 409-410.
11. Chang, L. S.,Lee, Y. S., Su, H. J., and Hung, T. H. 2003. First Report of *Papaya leaf curl virus* Infecting Papaya Plants in Taiwan. Plant Dis. 87: 204.
12. Cheng, Y.H., Deng, T.C., Chen, C. C., Chiang,C. H., and Chang, C. A. 2014. First report of *Euphorbia leaf curl virus and Papaya leaf curl Guangdong virus on passion fruit* in Taiwan. Plant Dis. 98: 1746.

13. Ferreira, S. S., Barros, D. R., de Almeida, M. R., and M. Zerbini, F. M. 2010. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. Plant Pathology 59: 221－230.
14. Fischer, I. H., and Rezende, J. A. M. 2008. Diseases of Passion flower (Passiflora spp). P. 2-9, in Pest Technology. Global Science Book.
15. Iwai, H., Ohmori, T., Kurokawa, Y., Muta, T., and Tari, K. 1996. New report of *passionfruit woodiness virus* in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan 62: 459-465.
16. Iwai1, H., Yamashita, Y., Nishi, N., and Nakamura, M. 2006. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species East Asian Passiflora virus (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus.* Arch Virology 151: 811－818.
17. Iwai, H., Terahara, R., Yamashita, Y., Ueda, S., and Nakamura, M. 2006. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian Passiflora potyvirus. Arch Virology 151: 1457-1460.
18. Ma, X. Y., Cai, J. H., Li, G. X., Qin, B. X., and Zhou, X. P. 2004. Molecular Characterization of a Distinct *Begomovirus* Infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. J. Phytopathology 152: 215-218.
19. Novaes, Q. S. Astua, J. F., Yuki, V. A., Kitajima, E. W., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. 2003. Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. Plant Pathology 52: 648-654.
20. Wu, C. Y., Lai, Y. C., Lin, N. S., Hsu, Y. H., Tsai, H. T., Liao, J. Y., and Hu, C. C. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. J. Virol. Methods 147:355–359.

The Current Status of Geminiviruses Occurred on Passion Fruit in Taiwan

Cheng, Y. H.[1,*], Chen, C. C. [1], and Deng, T. C. [1]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute
*Corresponding Author, E-Mail: YHCHeng@tari.gov.tw

Abstract

The main variety of passion fruit (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) cultivated in Taiwan is 'Tainung No. 1' which is a hybrid and propagated only by grafting. In the spring of 2011, plants with severe systemic mosaic and malformation on leaves were found in some orchards located in Puli, Nantou in the middle of Taiwan. However, after growing up to three months, most of these diseased plants became symptomless when the weather became warmer. In March of 2011, 2 leaf samples exhibiting mosaic and 3 samples showing malformation were collectec and tested by DAS-ELISA; none were positively reacted with antibodies against *Cucumber mosaic virus* (CMV), *East Asian passiflora virus* (EAPV), Passion fruit mottle virus (PaMV) or Passion fruit crinkle virus (PCV) that have been occurred in Taiwan. The rolling circle amplification (RCA) with hexamer primers was adopted to analyze the potential begomoviruses which were prevalent on the other crops in Taiwan. The RCA amplified products were digested with BamHI and separated on 1.2% agarose by gel electrophoresis. A fragment, about 3 kb, was purified from each gel and cloned into the respective site of pBluescript SK(-) individually. Clones were screened by EcoRI digestion and two types of restriction fragement length patterns were found among them. One type clone containing 2745nucleotides (Accession No. KC161185) with 98.5% identity to *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) and the other type clone containing 2732 nucleotide (Accession No. KC161184) with 91.7 identity to *Papaya leaf curl Guangdong virus* (PaLCuGDV) were revealed by nucleotide comparisons of their DNA-A in the GenBank. Accordingly, we confirmed the existence of passiflora isolates of EuLCV and PaLCuGDV. In a brief survey, allpassion fruit leaf samples were detected EuLCV and/or PaLCuGDV infectionTo our knowledge, this is the first report of begomoviruses associated passion fruit in Taiwan and in the Asia.

Key words: passion fruit, *Euphorbia leaf curl virus*, *Papaya leaf curl Guangdong virus*

圖 1、 初春栽培初期一品紅捲葉病毒與番木瓜捲葉廣東病毒感染台農一號百香果，造成葉片嵌紋、斑駁、不平整變形等病徵。

Fig. 1. *Papaya leaf curl Guangdong virus* and *Euphorbia leaf curl virus* was detected in the passion fruit Tainun No. 1 cultivar plant with severe systemic mosaic and malformation on leaves .

表一、感染百香果雙生病毒鞘蛋白基因比較。

Table 1. Percentages of sequence identity between nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences of the coat protein gene of the passion fruit infecting-begomoviruses.

(nt/ aa)

	EuLCV	JMV	PLLMV	PSLDV
PaLCuGDV-PF	76.7/ 84.2	72.6/ 84.2	73.9/ 85.3	73.0/ 85.3
EuLCV		69.8/ 79.7	71.9/ 81.9	70.5/ 80.8
JMV			86.5/ 95.5	85.9/ 96.0
PLLMV				92.1/ 97.2

Accession number of PaLCuGDV-PF (*Papaya leaf curl Guangdong virus*), KC161184. EuLCV (*Euphorbia leaf curl virus*), KC161185. JMV (*Jatropha mosaic virus*), AF058025. PLLMv (*Passion flower little leaf mosaic virus*), AY167565. PSLDV (Passionfruit severe leaf distortion virus), AY167566.